

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-284892

(43)Date of publication of application : 11.10.1994

(51)Int.Cl.

C12P 7/62  
C08G 63/60

(21)Application number : 04-148686

(71)Applicant : DOI YOSHIHARU  
NITTO DENKO CORP

(22)Date of filing : 14.05.1992

(72)Inventor : DOI YOSHIHARU  
YOSHIDA YOSHITOKU

## (54) PRODUCTION OF POLYESTER

### (57)Abstract:

PURPOSE: To easily and selectively produce a bio-degradable polyester by proliferating a microbial strain belonging to the genus Pseudomonas and capable of producing poly-3-hydroxybutyrate and accumulating the product while restricting either one of N, P and inorganic nutrients in the presence of a substrate.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to the genus Pseudomonas and capable of producing poly-3-hydroxybutyrate (e.g. Pseudomonas acidovorans IFO-13582) is proliferated by a pre-stage cultivation and then subjected to a post-stage cultivation in the presence of substrates selected respectively from 1propanol or 1-pentanol and 1,3-propanediol or 1,5-pentanediol while restricting the amount of either one of nitrogen, phosphorus and inorganic nutrients. The polyester formed and accumulated in the microbial cell is separated to obtain the objective polyester having bio-degradability and containing one or more units such as 3-hydroxybutyrate unit, 3-hydroxyvalerate unit and 3- hydroxypropionate unit.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has Polly 3-hydroxy butyrate productivity within a culture medium, Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of A and B which are shown below, respectively. A. 1-propanol or 1-pentanol B. 1,3-propanediol or 1,5-pantanediol 3-hydroxy butyrate unit, The manufacture approach of the polyester characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from the 3-hydroxy BARIRETO unit and the 3-hydroxy propionate unit.

[Claim 2] The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has Polly 3-hydroxy butyrate productivity within a culture medium, Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of C and D which are shown below, respectively. C. 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol D. 1,3-propanediol, or 1,5-pantanediol 3-hydroxy butyrate unit, The manufacture approach of the polyester characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from the 4-hydroxy butyrate unit and the 3-hydroxy propionate unit.

---

[Translation done.]



the obtained polyester. 1 H-NMR (100MHz) analysis it measures at a room temperature using JEOL FX-100, and is CDCL3. A solvent and 15 microseconds Pulse width (45-degree pulse include angle), pulse repetition-time:5 seconds and 8K data point it carried out on conditions. In addition, TMS was used as a standard reagent.

[0024] The sigma value (ppm) of said 1 H-NMR (100MHz) analysis [1.24-1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methine group)], [0.82-0.96 (methyl group), 2.33-2.58 (the 1st methylene group), 1.50-1.70 (the 2nd methylene group), 5.03-5.34 (methine group)], [2.33-2.58 (the 1st methylene group), and 4.27-4.39 (the 2nd methylene group)] It was identified 3HB, 3HV, and 4HB, from it having been, respectively. This result is shown in drawing 1.

[0025] (Examples 2-5) The polyester of an example 1 and the same examples 2-5 was obtained except having prepared at a mixed rate that 1-pentanol and 1,5-pentanediol are shown in Table 1 as a carbon source in latter-part culture.

[0026]

[Table 1]

	3HB 3HV 4HB												上部融点(℃)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	
1-C9H-6	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0	—	—	—	—	—	5.0	—	—	—
1,5-C9H2-6	4.0	3.0	2.5	2.0	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,4-C7H5-6	—	—	—	—	—	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0	—	5.0	—	—
1,5-C7H5-6	—	—	—	—	—	4.0	3.0	2.5	2.0	1.0	—	—	—	—
4-LN15 3HB	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.0
空缺	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0

(MIX: g)

[0027] (Examples 6-10) The polyester of an example 1 and the same examples 6-10 was obtained except having prepared at a mixed rate that 1,4-butanediol and 1,5-pentanediol are shown in Table 1 as a carbon source in latter-part culture. Proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz) and 13 C-NMR (125 MHz) analysis were presented with the polyester obtained in the example 6 on the same conditions as an example 1. 13 C-NMR (125 MHz) analysis is JEOL GX-100. It uses, and measures at 27 degrees C, and they are CDCL3 solvent and 5.5 microseconds. Pulse width (45-degree pulse include angle) and pulse repetition time: It carried out on condition that 84Kdata point for 5 seconds. In addition, TMS was used as a standard reagent.

[0028] In the example 6, the sigma value (ppm) of 1 H-NMR (100MHz) analysis [1.24-1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methine group)], [2.33-2.58 (the 1st methylene group) and 1.78-2.09 (the 2nd methylene group), 4.06-4.18 (3rd methylene group)], [2.33-2.58 (the 1st methylene group), and 4.27-4.39 (the 2nd methylene group)] It was identified 3HB, 4HB, and 3HP, from it having been, respectively. This result is shown in drawing 2.

[0029] moreover, the sigma value (ppm) of 13 C-NMR (125 MHz) analysis — 169.83 to 3HP, — 3HB was identified for 170.04 to 3HB ← 4HB, and 169.14 to 3HB ← 3HB was identified [ 172.62 to 4HB ← 4HB / 171.85 to 4HB ← 3HB ] for 3HB ← 3HP, from 169.68, respectively. This result is shown in drawing 3.

[0030] (Example 1 of a comparison) In latter-part culture, the same polyester as an example 1 was obtained except having used only 5.0g only of 1-pentanol, as shown in said Table 1 as a carbon source. Proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz) analysis was presented with the obtained polyester on the same conditions as an example 1. It was identified 3HB and 3HV, respectively from this sigma value (ppm) having been [1.24-1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42] (methine group), and [0.82-0.96 (methyl group), 1.50-1.70 (the 1st methylene group), 2.33-2.58 (the 2nd methylene group) and 5.03-5.34] (methine group). This result is shown in drawing 4.

[0031] (Example 2 of a comparison) In latter-part culture, the same polyester as an example 1 was obtained except having used only 5.0g only of 1,4-butanediol, as shown in Table 1 as a carbon source. Proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz) analysis was presented with the obtained polyester on the same conditions as an example 1. It was identified 3HB and 4HB, respectively from this sigma value (ppm) of this having been [1.24-1.30 (methyl group), 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methine group), and 4.06-4.18 (the 1st methylene group), 1.78-2.09 (the 2nd methylene group) and 2.33-2.58] (the 3rd methylene group). This result is shown in drawing 5.

[0032] (Example 3 of a comparison) As Alcaligenes you TOROFASU ATCC 17699 is used instead of Pseudomonas acidovorans as a fungus body and it is shown in Table 1 as a carbon source of latter-part culture, they are 17g of 4-hydroxybutyrate, and 3g of valeric acids. Polyester was obtained like the example 1 except having used. Proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz) analysis was presented with the obtained polyester on the same conditions as an example 1. This sigma value (ppm) [1.24-1.30 (methyl group) and 2.33-2.58 (methylene group), 5.10-5.42 (methine group), [0.82-0.96 (methyl group), 1.50-1.70 (the 1st methylene group) and 2.33-2.58 (the 2nd methylene group)] It was identified 3HB, 3HV, and 4HB, respectively from it having been [5.03-5.34 (methine group), and 4.06-4.18 (the 1st methylene group), 1.78-2.09 (the 2nd methylene group) and 2.33-2.58] (the 3rd methylene group). This result is shown in drawing 6.

[0033]

[Test Example(s)] Each presentation ratio was calculated using the polyester obtained in examples 1-10 and the examples 1-3 of a comparison from the integral value of proton-magnetic-resonance-spectrum 1 H-NMR (100MHz). Moreover, the melting point (Tm) DSC measurement determined. This result is shown in Table 2.

[Table 2]

	3HB 3HV 4HB												上部融点(℃)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	
ECB固体濃度(g/l)	3.0	3.7	4.1	3.8	3.9	2.8	2.7	3.1	2.8	2.9	4.0	5.3	9.2	
充填合率 含水率(%)	5	6	6	3	8	3	5	T	10	4	12	15	44	
共 組成 成合 比	3HB	8.7	4.8	4.1	4.1	3.0	8.2	6.0	3.4	1.8	1.0	3.2	1.9	4.9
3HV	3.0	5.0	5.8	5.8	6.3	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.34
モル % 3HP	4HB	0	0	0	0	0	1.4	3.8	8.2	7.9	8.8	0	8.1	1.7
	3	2	1	1	1	1	4	4	4	3	4	0	0	0
融点 (℃)	148	79	75	81	78	125	50	49	54	52	101	51	97	

[0035]

[Effect of the Invention] The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad in which this invention has Poly 3-hydroxy butyrate productivity within a culture medium as explained in full detail above. Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of A and B which are shown below, respectively. A. 1-propanol or 1-pentanol B. 1,3-propanediol or 1,5-pentanediol 3-hydroxy butyrate unit, A 3-hydroxy BARRETO unit. The preceding paragraph culture which proliferates a fungus body for the pseudomonad which has the

manufacture approach of polyester and Poly 3-hydroxy butyrate productivity which are characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units chosen from 3-hydroxy propionate units within a culture medium. Restrict any one of nitrogen, Lynn, or mineral nutrients, and polyester is generated in a fungus body. It is the manufacture approach of the polyester which it makes it come two steps to cultivate by latter-part culture to store up. Culture of said latter part is performed under existence of the substrate chosen from the group of C and D which are shown below, respectively. C. 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol D. 1,3-propanediol, or 1,5-pentanediol 3-hydroxy butyrate unit. Since it is the manufacture approach of the polyester characterized by obtaining the polyester which consists of at least one or more units out of a 4-hydroxy butyrate unit and a 3-hydroxy propionate unit. The outstanding effectiveness that \*\*\*\*\* can perform also manufacturing the high copolymer of utility value alternatively and very easily industrially is done so.

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

**[Brief Description of the Drawings]**

**[Drawing 1]** It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 1.

**[Drawing 2]** It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 6.

**[Drawing 3]** They are the same as the above and 13 C-NMR (125 MHz) spectrum Fig.

**[Drawing 4]** It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 1 of a comparison.

**[Drawing 5]** It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 2 of a comparison.

**[Drawing 6]** It is 1 H-NMR (100MHz) spectrum Fig. of the polyester obtained in the example 3 of a comparison.

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-284892

(43)公開日 平成6年(1994)10月11日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 7/62  
C 08 G 63/60

識別記号  
N P S

府内整理番号  
7432-4B  
7107-4J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-148686	(71)出願人 591055012 土肥 義治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39
(22)出願日	平成4年(1992)5月14日	(71)出願人 000003964 日東电工株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号
		(72)発明者 土肥 義治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617番地の39
		(72)発明者 吉田 良徳 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東 电工株式会社内
		(74)代理人 弁理士 清原 義博

(54)【発明の名称】 ポリエステルの製造方法

(57)【要約】

【構成】 ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するショードモナス属菌を、培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養とする。この二段培養において、特に後段培養を(A)1-プロパノール又は1-ペントノール及び(B)1,3-プロパンジオール又は1,5-ペントジオールの存在下で行い、3-ヒドロキシブチレート単位(3HB)、3-ヒドロキシバレリート単位(3HV)、3-ヒドロキシプロピオネート単位(3HP)の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを製造する。

【効果】 3HB、3HV、3HPの中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを選択的且つ容易に製造することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養により二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すA及びBの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、  
 A. 1-ブロバノールまたは1-ベンタノール  
 B. 1, 3-ブロバンジオールまたは1, 5-ベンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシバリレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項2】 ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養により二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すC及びDの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、  
 C. 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール  
 D. 1, 3-ブロバンジオールまたは1, 5-ベンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明はポリエステルの製造方法に係り、その目的は3-ヒドロキシブチレート単位(以下3HBと記す)、3-ヒドロキシバリレート単位(以下3HVと記す)、3-ヒドロキシプロピオネート単位(以下3HPと記す)の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステル及び3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位(以下4HBと記す)、3-ヒドロキシプロピオネート単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルといった実用上有用なポリエステルを容易に製造することのできるポリエステルの製造方法の提供にある。

## 【0002】

【発明の背景】 プラスチック廃棄物の処理問題が世界的な規模で深刻化しているが、この問題を円滑に解消できる新素材として、微生物によって生成される「生分解性プラスチック」が注目されはじめてきている。この「生分解性プラスチック」は自然界の微生物によって速

やかに完全分解され、生態系の循環サイクルに還元されるため、廃棄物処理や物質循環、環境汚染等の観点から、バイオポリマーとして非常に注目されている。このような「生分解性プラスチック」として最初に見出されたのは、エネルギー貯蔵物質として多くの微生物の菌体内に蓄積されているポリ-3-ヒドロキシブチレート(以下、PHBという)であった。このPHBは3HBが多数連結して構成される熱可塑性の高分子物質であるが、結晶性が高すぎるために耐衝撃性に劣り、硬くて脆い材料であること、及び生産コストが高いことなどから実用化が見送られてきた。

【0003】 そこで、このPHBについてさらに研究が進められ、3HBとともに側鎖に3HVが共重合されたポリエステルや3HBと4HBとの共重合によるポリエステル、更には3HBと4HB・3HVからなるポリエステルなど、次々と新しい共重合成分からなるポリエステルが見出され、醸酵法による工業的な生産が検討されてくるようになってきた。このようなポリエステルは、例えば3HBと3HVからなる共重合体では、3HV分率0~95%の広い組成範囲にわたり50%以上の高い結晶性を示し、3HV分率によって70~178°Cの融点を示すことができる。また、3HBと4HBからなる共重合体では4HB分率を調整することにより結晶化度を低下させることが可能となることが知られている。あるいは、*A. faecalis T<sub>1</sub>*の分解酵素を用いた酵素分解性においては、4HB含有率の低い(6~28%)ものはPHBホモポリマーに比べて酵素分解速度が速くなっているが、4HB含有率が高い(85~94%)と逆に遅くなることも見い出されている。さらに、加水分解においては4HB含有率が高くなる程速くなることが見い出され、徐放性の薬物を作る場合には4HB含有率を高くすることによって薬物の放出を速くできることが知られてきた。このように3HB、4HB、3HVの各分率を適宜調製することにより、実用に際してより幅の広い選択が可能となる。

## 【0004】

【従来の技術】 微生物を用いたポリ-3-ヒドロキシブチレート(PHB)を製造する手法としては、従来よりポリエステル生産能を有する微生物を窒素又はりんを制限して培養する方法が使用されており、特にポリエステルの生成、蓄積を促す培養において、プロピオン酸あるいはイソ酪酸等の有機酸を炭素源として使用する技術が特開昭57-150393号公報「β-ヒドロキシブチレート重合体およびその製造法」にて開示されている。

【0005】 また、特開平1-156320号公報にて3HB成分に対する共重合成分、すなわち4HB及び3HV成分の割合が比較的高いポリエステルを製造する技術が開示されている。この開示技術はアルカリゲネス属菌を用い、且つこの菌体の培養において、例えば吉草酸および4-ヒドロキシ酪酸を炭素源として使用してポリエステ

ルを製造する技術であった。

【0006】しかしながら、前記した特開昭57-150393号公報の技術では、実際に実施例においては最高33 mol%の3HV成分を含む共重合体しか示されておらず、3HV成分の割合がこれより多い共重合体については何ら開示されていなかった。また、共重合体中の3HV成分为0-33mol%まで増大すると、この増大に伴って融解温度(Tm)が180°Cから85°Cまで急激に低下することが知られており[T.L.Bluhm et al., Macromolecules, 19, 2871-2876(1986)]、この点から工業的に同一の物性を持つ製品を得ることが困難であることが示唆される。また、この開示技術においては微生物の培養基質に有機酸を使用しているために、ポリエステル蓄積段階における培養液中のpHの制御が困難なものとなるという課題も存在した。

【0007】一方、特開平1-156320号公報にて開示されている技術も前記した特開昭57-150393号公報の開示技術と同様、培養基質に吉草酸や4-ヒドロキシ酪酸等の有機酸が使用されているためpHの制御が困難なものとなる課題が存在した。またこの技術においては、ポリエステル中の各成分の比率が3HB成分10-90mol%、4HB成分3-60mol%、3HV成分5-87mol%と開示されているが、4HB成分の含有がこれよりも多い共重合体については何ら示されていなかった。さらに、この技術にて使用される吉草酸や4-ヒドロキシ酪酸等は容易に入手できるものではなく、実用には適していないという課題も存在した。

【0008】このような実情に照らし、この出願人によって特願平4-56725号「ポリエステル共重合体の製造方法」が先に出願されている。この技術は、微生物(シュードモナス属菌)によりポリエステルを生成、蓄積させる培養時に、工業的に入手しやすい特定のジオール。

(1,4-ブタンジオール又は1,6-ヘキサンジオール)と特定のアルコール(メタノール以外の奇数個の炭素原子をもつ第一級アルコール)を炭素源として用いる技術であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】前記したこの出願人による既出願の技術は、pH制御を容易に行うことができるとともに、3HB、4HB、3HVとの共重合体において4HB成分の割合(モル比)が大きい共重合体を生成させることのできる優れた製造方法であった。しかしながら、業界では前記した3HB、4HB、3HVからなる共重合体の変性共重合体、すなわち新たに3HP成分为含有された共重合体が、高融点及び分解速度を幅広く制御でき、工業的により実用的な材料となりうるという点において着目されるようになり、この3HP成分为含有した共重合体をも容易に製造できる製造方法の創出がさらに望まれていた。

【0010】

【課題を解決するための手段】この発明では、ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュードモナス属菌を培地内で菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すA及びBの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

- A. 1-ブロバノールまたは1-ベンタノール
- 10 B. 1, 3-ブロバンジオールまたは1, 5-ベンタジオール  
3-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシバリレート単位、3-ヒドロキシプロピオネット単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法及びポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシュードモナス属菌を培地内で菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すC及びDの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、
- C. 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール
- D. 1, 3-ブロバンジオールまたは1, 5-ベンタジオール  
3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシプロピオネット単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法を提供することにより前記從来の課題を悉く解消する。

【0011】

【発明の構成】以下、この発明に係るポリエステルの製造方法の構成について説明する。この発明ではPHB生産能を有する微生物として特定シュードモナス属菌を使用する。このシュードモナス属菌としては、シュードモナス・テストステロニ(*Pseudomonas testosteroni*)、シュードモナス・デラフィールディ(*Pseudomonas delafieldii*)、シュードモナス・セバシア(*Pseudomonas cepacia*)及びこれらの菌株の突然変異株等が好適に使用され、特にシュードモナス・アシドボランス(*Pseudomonas acidovorans*)が実験的知得により最も好ましく、なかでもシュードモナス・アシドボランスIFO-13582, ATCC-15668がより好ましく使用される。

【0012】これらの微生物は、まず栄養豊富な培地において菌体を増殖させる前段の培養と、窒素、リンあるいは各種無機栄養素といった菌体の成長の必須成分のうちのいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段の培養との2段階にて培養される。このように窒素等の成長必須成分のいずれか一つを全く

含まないか、若しくは培養中で成長必須成分を枯渇させることにより、菌体の成長が制限され、ポリエステルの合成が効率良く行なえる。この培養法としては、回分式方法あるいは連続培養のいずれを用いてもよく、特に限定はされない。前段の培養法については特に限定はされず常法に従って菌体を増殖させる。この前段の培養により増殖させた菌体は、濾過あるいは遠心分離などにより培養液と分離し、後段の培養へと移行される。或いは、前段の培養において菌体を増殖する過程で、培地中の成長に必須の成分のうちの少なくとも1つが消費された後に後段へ移行してもよい。この際、成長の必須成分としてはカリウムやマグネシウムなどの無機栄養素よりも、窒素若しくはリンを制限した方がポリエステルの生成、蓄積には好適であるがこの発明においては特に限定はされない。

【0013】培地成分としては、炭素源としてグルコース、フラクトース、マンノースなどの糖類、メタノール、エタノール、酢酸、酪酸などの合成炭素源、酵母エキス、ペプトン、肉エキスなどの天然物等が好適な実施例として例示されるが特に限定はされない。また、窒素源としてはアンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素化合物等が好適に例示される。リン源としてはリン酸塩が、さらに無機栄養素としてはカリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛、銅などの無機塩の陽イオンが好適に与えられる。

【0014】この培養条件としては、前段および後段のいずれもそれぞれ温度 20 ~ 40 °C程度、pH 6 ~ 10 程度の範囲内において好気的に培養する。

【0015】菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段の培養において、この発明では特に基質として、(A) 1-プロパノール又は 1-ペンタノール及び(B) 1, 3-ブロバンジオール又は 1, 5-ペンタジオールが使用される。これは、この発明者らがシードモナス属菌を用い、3HB 単位、3HV 单位、3HP 単位からなるポリエステルの製造法について鋭意検討した結果、これら基質を用いることによって、pH 制御が容易に行なえるとともに、3HB 単位、3HV 单位、3HP 単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを選択的に生成、蓄積できるとの実験的知得に基づくものである。

【0016】あるいは、前記した 3HB、3HV、3HP の中から選択された一以上の単位からなるポリエステル以外に、3HB、4HB、3HP の中から選択された一以上の単位からなるポリエステルを生成させる場合には、後段の培養において基質として (C) 1, 4-ブタジオールまたは 1, 6-ヘキサンジオール及び (D) 1, 3-ブロバンジオールまたは 1, 5-ペンタジオールが使用される。これはこの発明者らの鋭意研究による実験的知得に基づくもので、このような基質を用いる

ことにより、3HB、4HB、3HP 単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを選択的に効率良く生成させることができる。

【0017】これらの基質の培養液中の濃度は、ポリエステルを生成させることができ、且つ微生物の育成を阻害しない量であれば特に限定されることはないが、

(A) 1-プロパノール又は 1-ペンタノール及び

(B) 1, 3-ブロバンジオール又は 1, 5-ペンタジオールを合計した炭素源濃度または (C) 1, 4-ブタジオールまたは 1, 6-ヘキサンジオール及び

(D) 1, 3-ブロバンジオールまたは 1, 5-ペンタジオールを合計した炭素源濃度が、約 0.05 ~ 3.0 % 程度の範囲内とされるのが好ましい。

【0018】これらの基質は、後段の培養中に連続で用いた方が好ましいが、一部分でも用いられればよく、また数回に分けて与えてもよく、特に限定はされない。また、後段の培養でこれらの基質のみを用いてもよいが、資化可能な炭素源、好ましくは酸以外の、例えばグルコース、フラクトース、メタノール、エタノール等の pH 制御が容易な炭素源を混合させることもできる。

【0019】培養終了後、濾過あるいは遠心分離などにより培養液から菌体を分離し、菌体内に蓄積された 3HB、3HV、3HP の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステル又は 3HB、4HB、3HP の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを抽出する。この抽出方法としては特に限定はされず、例えばクロロホルムのような溶剤で抽出し、この抽出液をヘキサンなどの貧溶媒で沈殿させることによって容易に得ることができる。

30 【0020】

【実施例】以下、実施例を挙げてこの発明に係るポリエステルの製造方法及びその効果をより一層詳細に説明する。

【0021】(実施例 1) シュードモナス・アンドボランス (*Pseudomonas acidovorans*) IFO-13582 を用いてポリエステルを製造した。まず、蒸留水 1 リットル中にポリペプトン 10g、酵母抽出物 10g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g、肉エキス 5g を混合して培養液を調製し、この培養液で菌体を 26°C、48 時間培養して菌体を増殖させ、前段培養を行った。

【0022】前段培養終了後、遠心分離により菌体を分離した。リン、マグネシウム、微量元素等の無機栄養素、及び炭素源として 1-ペンタノール、1, 5-ペンタジオールを用い、下記の処方に従って培養液を調製した。この培養液を pH 7.0 に調製した後、分離された菌体をこの培養液に移行した。この培養液にて 26°C で 96 時間後段培養を行い、ポリエステルの菌体内での生成、蓄積を行った。

(蒸留水 1 リットル中)

50 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.8g MgSO<sub>4</sub> 0.12g

7  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.7g 1-ペンタノール 1.0g  
 ※微量元素 1ml 1, 5-ペンタンジオール 4.0g

※微量元素溶液とは、1N塩酸中に下記の無機栄養素を含むものである。

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.78g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.67g  
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.98g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.17g  
 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.81g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.29g

培養終了後、遠心分離により菌体を培養液から分離し、水洗いした後クロロホルムで抽出した。抽出液をいったん濃縮し、この濃縮液にヘキサンを加えて、得られたポリエステルを沈殿させた。沈殿物を回収し、乾燥してポリエステルを得た。

【0023】得られたポリエステルはプロトン磁気共鳴スペクトル<sup>1</sup> H-NMR(100MHz)分析に供した。<sup>1</sup> H-NMR(100MHz)分析は JEOL FX-100を用いて室温で測定し、CDCl<sub>3</sub> 溶媒、15μs パルス幅(45° パルス角度)、\*

\*パルス繰り返し時間：5秒、8K data point の条件にて行った。尚、標準試薬としてはTMSを用いた。

【0024】前記<sup>1</sup> H-NMR(100MHz)分析の $\delta$ 値(ppm)は {1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチレン基), 5.10-5.42(メチン基)}、{0.82-0.96(メチル基), 2.3-2.58(第1メチレン基), 1.50-1.70(第2メチレン基), 5.03-5.34(メチン基)}、{2.33-2.58(第1メチレン基), 4.27-4.39(第2メチレン基)}であったことからそれぞれ3HB、3HV、3HPと同定された。この結果を図1に示す。

【0025】(実施例2～5)後段培養における炭素源として1-ペンタノール及び1, 5-ペンタンジオールを表1に示すような混合割合にて調製した以外は実施例1と同様の実施例6～10のポリエステルを得た。

【0026】

【表1】

	実施例										上ヒト交換		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3
1-ペンタノール	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0	—	—	—	—	—	5.0	—	—
1, 5-ペンタンジオール	4.0	3.0	2.5	2.0	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—
1, 4-ブタンジオール	—	—	—	—	—	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0	—	5.0	—
1, 5-ペンタンジオール	—	—	—	—	—	4.0	3.0	2.5	2.0	1.0	—	—	—
4-ヒドロキシ 酢酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17.0
吉草酸	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.0

(単位: g)

【0027】(実施例6～10)後段培養における炭素源として1, 4-ブタンジオール及び1, 5-ペンタンジオールを表1に示すような混合割合にて調製した以外は実施例1と同様の実施例6～10のポリエステルを得た。実施例6にて得られたポリエステルは、実施例1と同様の条件にてプロトン磁気共鳴スペクトル<sup>1</sup> H-NMR(100MHz)及び<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz)分析に供した。

<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz)分析は、JEOL GX-100を用いて27°Cにて測定し、CDCl<sub>3</sub> 溶媒、5.5μs パルス幅(45° パルス角度)、パルス繰り返し時間：5秒、64Kdata pointの条件にて行った。尚、標準試薬としてはTMSを用いた。

【0028】実施例6では<sup>1</sup> H-NMR(100MHz)分析の $\delta$ 値(ppm)が {1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチレン基), 5.10-5.42(メチン基)}、{2.33-2.58(第1メチレン基), 1.78-2.09(第2メチレン基), 4.06-4.18(第3メチレン基)}、{2.33-2.58(第1メチレン基), 4.27-4.39(第2メチレン基)} であったことからそれぞれ3HB、4HB、3HPと同定された。この結果を図2に示す。

【0029】また、<sup>13</sup>C-NMR(125 MHz)分析の $\delta$ 値(ppm) 172.62から4HB\*-4HBが、171.85から4HB\*-3HBが、170.04から3HB\*-4HBが、169.83から3HP\*-3HBが、169.68から3HB\*-3HPが、169.14から3HB\*-3HBがそれぞれ同定された。この結果を図3に示す。

【0030】(比較例1)後段培養において、炭素源として前記表1に示すように1-ペンタノールのみを5.0g用いた以外は実施例1と同様のポリエステルを得た。得られたポリエステルは実施例1と同様の条件にてプロトン磁気共鳴スペクトル<sup>1</sup> H-NMR(100MHz)分析に供した。この $\delta$ 値(ppm)が {1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチレン基), 5.10-5.42(メチン基)}、{0.82-0.96(メチル基), 1.50-1.70(第1メチレン基), 2.33-2.58(第2メチレン基), 5.03-5.34(メチン基)} であったことからそれぞれ3HB、3HVと同定された。この結果を図4に示す。

【0031】(比較例2)後段培養において、炭素源として表1に示すように1, 4-ブタンジオールのみを5.0g用いた以外は実施例1と同様のポリエステルを得た。得られたポリエステルは実施例1と同様の条件にてプロ

トン磁気共鳴スペクトル<sup>1</sup> H-NMR (100MHz)分析に供した。このこのδ値(ppm)が {1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチレン基), 5.10-5.42(メチン基)}、{4.06-4.18(第1メチレン基), 1.78-2.09(第2メチレン基), 2.33-2.58(第3メチレン基)}であったことからそれぞれ3HB、4HBと同定された。この結果を図5に示す。

【0032】(比較例3) 菌体としてシードモナス・アシドボラーンスのかわりにアルカリゲネス・ユートロファスATCC 17699を用い、後段培養の炭素源として表1に示すように4ヒドロキシ酪酸17g、吉草酸3gを用いた以外は実施例1と同様にポリエステルを得た。得られたポリエステルは実施例1と同様の条件にてプロトン磁気共鳴スペクトル<sup>1</sup> H-NMR (100MHz)分析に供した。このδ値(ppm)が {1.24-1.30(メチル基), 2.33-2.58(メチル基), 5.10-5.42(メチン基)}、{4.06-4.18(第1メチレン基), 1.78-2.09(第2メチレン基), 2.33-2.58(第3メチレン基)}であったことからそれぞれ3HB、3HV、4HBと同定された。この結果を図6に示す。

\* チレン基), 5.10-5.42(メチン基) }、{0.82-0.96(メチル基), 1.50-1.70(第1メチレン基), 2.33-2.58(第2メチレン基), 5.03-5.34(メチン基) }、{4.06-4.18(第1メチレン基), 1.78-2.09(第2メチレン基), 2.33-2.58(第3メチレン基) }であったことからそれぞれ3HB、3HV、4HBと同定された。この結果を図6に示す。

## 【0033】

【試験例】実施例1~10及び比較例1~3で得られたポリエステルを用いてプロトン磁気共鳴スペクトル<sup>1</sup> H-NMR (100MHz)の積分値から各組成比を計算した。また融点(T<sub>m</sub>)をDSC測定により決定した。この結果を表2に示す。

## 【0034】

【表2】

	実施例												上記交例		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3		
乾燥菌体重量(g/l)	3.6	3.7	4.1	3.8	3.9	2.8	2.7	3.1	2.8	2.9	4.0	5.3	9.2		
共重合体含有率(%)	5	6	6	3	8	3	5	7	10	4	12	16	44		
共重合体成合比体	3HB	67	48	41	41	36	82	60	34	18	10	32	19	49	
モル%	3HV	30	50	58	58	63	0	0	0	0	0	68	0	34	
	4HB	0	0	0	0	0	14	36	62	79	86	0	81	17	
	3HP	3	2	1	1	1	4	4	4	3	4	0	0	0	
融点(°C)	146 140	79 138	75 139	81 139	78	125	50	49	54	52	101	51	82 91		

## 【0035】

【発明の効果】以上詳述した如く、この発明はポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すC及びDの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

- A. 1-プロパノールまたは1-ベンタノール
- B. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ベンタンジオール

3-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシバリレート単位、3-ヒドロキシプロピオネット単位の中から選択された少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法及びポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するシードモナス属菌を培地内にて菌体を増殖させる前段培養と、窒素、リン又は無機栄養素のうちいずれか一つを制

限して菌体内にポリエステルを生成、蓄積させる後段培養とにより二段培養させてなるポリエステルの製造方法であって、前記後段の培養を次に示すC及びDの群からそれぞれ選択された基質の存在下で行い、

- C. 1, 4-ブタンジオールまたは1, 6-ヘキサンジオール
- D. 1, 3-プロパンジオールまたは1, 5-ベンタンジオール

40 3-ヒドロキシブチレート単位、4-ヒドロキシブチレート単位、3-ヒドロキシプロピオネット単位の中から少なくとも一以上の単位からなるポリエステルを得ることを特徴とするポリエステルの製造方法であるから、産業的に利用価値の高い共重合体をも選択的、且つ極めて容易に製造することができるという優れた効果を奏する。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1にて得られたポリエステルの<sup>1</sup> H-NMR (100MHz)スペクトル図である。

50 【図2】実施例6にて得られたポリエステルの<sup>1</sup> H-N

(7)

特開平6-284892

12

11

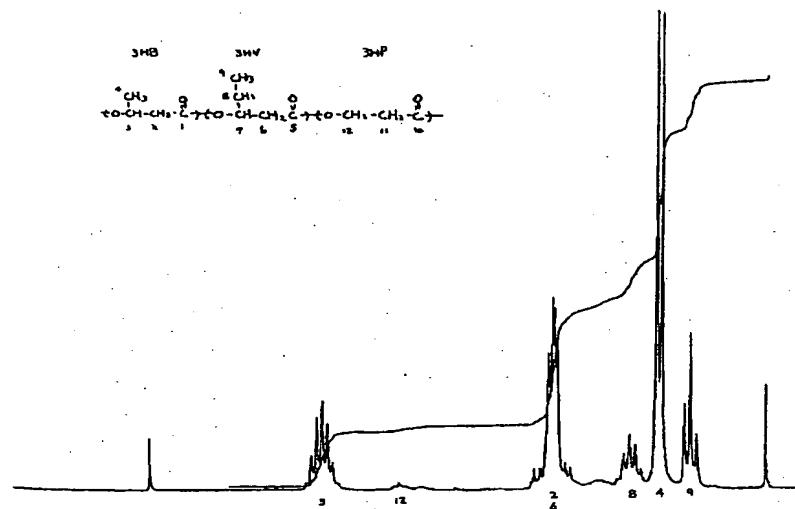
MR(100MHz)スペクトル図である。

【図3】同上、 $^{13}\text{C}$ -NMR(125MHz)スペクトル図である。【図4】比較例1にて得られたポリエステルの $^1\text{H}$ -NMR(100MHz)スペクトル図である。

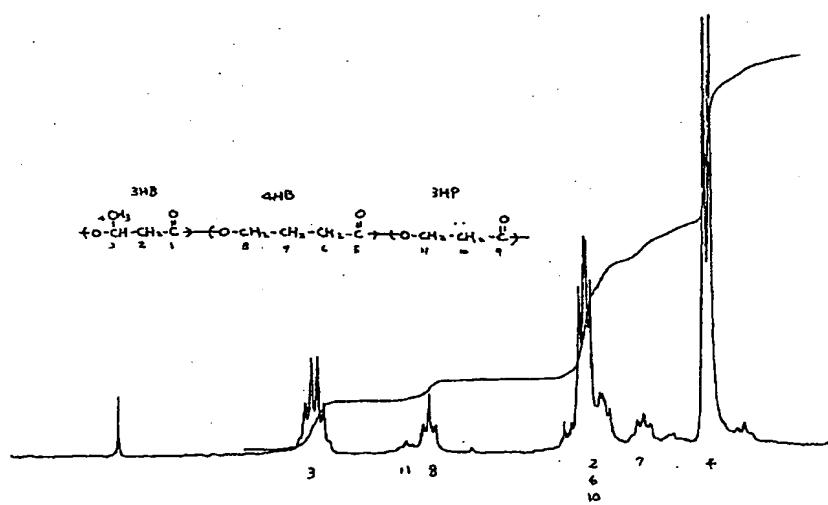
\*

\*【図5】比較例2にて得られたポリエステルの $^1\text{H}$ -NMR(100MHz)スペクトル図である。【図6】比較例3にて得られたポリエステルの $^1\text{H}$ -NMR(100MHz)スペクトル図である。

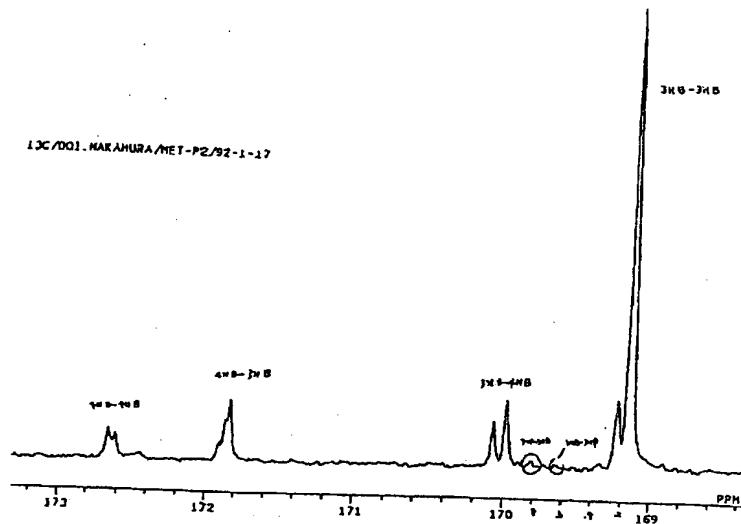
【図1】



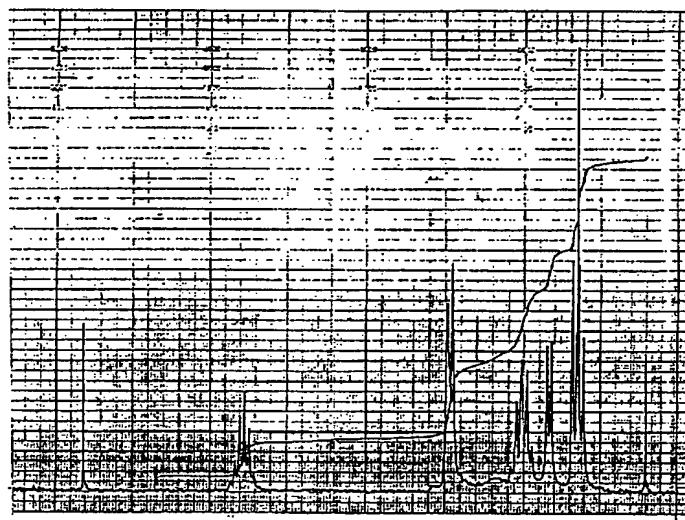
【図2】



【図3】



【図4】

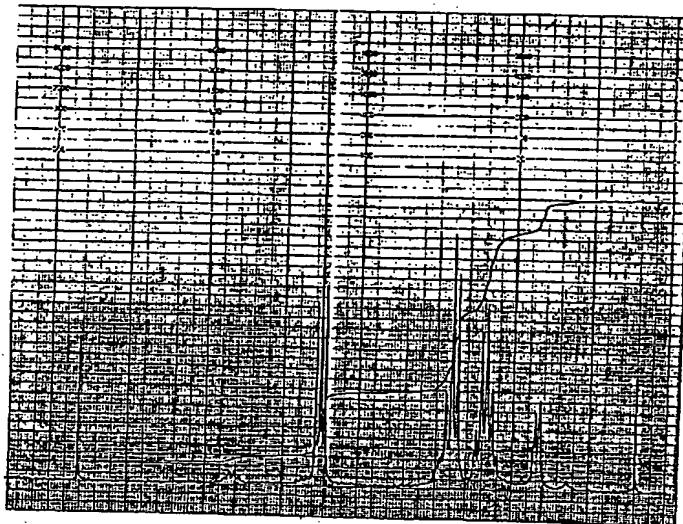


BEST AVAILABLE COPY

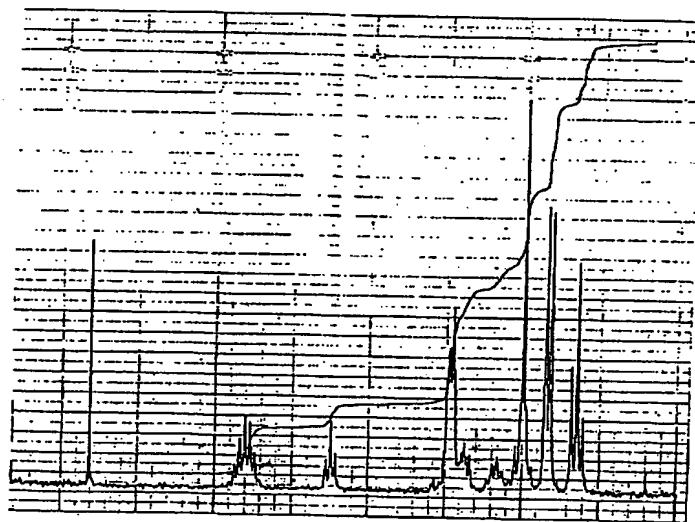
(9)

特開平6-284892

【図5】



【図6】



BEST AVAILABLE COPY